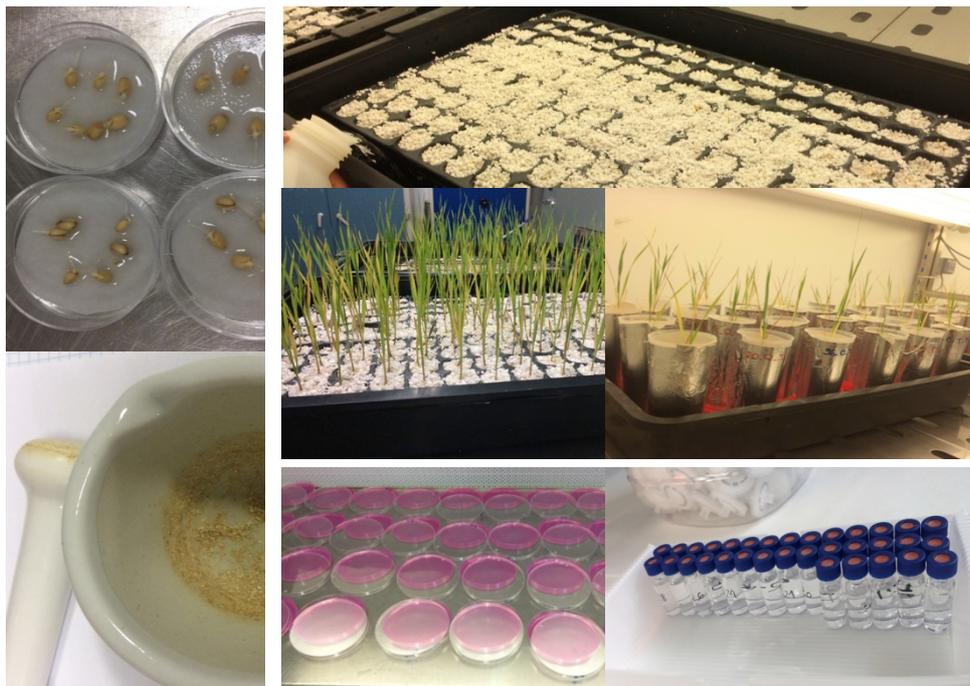




Universidad de Sevilla
Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica

TRABAJO FIN DE GRADO

Efecto de la aplicación de microorganismos (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* T34) y ácidos orgánicos, en un medio calcáreo con diferentes formas de Zn y dosis de P, sobre la bioacumulación de P y Zn en trigo



Titulación: Grado en Ingeniería Agrícola. Especialidad Explotaciones Agropecuarias

Mireya Galeote Cobos

Sevilla, Septiembre 2017

Universidad de Sevilla

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica.

Departamento de Ciencias Agroforestales

TRABAJO FIN DE GRADO

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS (*BACILLUS SUBTILIS* Y *TRICHODERMA ASPERELLUM* T34) Y ÁCIDOS ORGÁNICOS, EN UN MEDIO CALCÁREO CON DIFERENTES FORMAS DE Zn Y DOSIS DE P, SOBRE LA BIOACUMULACIÓN DE P Y Zn EN TRIGO

Titulación: Grado en Ingeniería Agrícola. Especialidad Explotaciones Agropecuarias

Sevilla, Septiembre 2017

Autora

Mireya Galeote Cobos

Directores

Dr. Antonio Delgado García

Universidad de Sevilla

Aurora Moreno Lora

Universidad de Sevilla

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecerle a Antonio Delgado la oportunidad que me ha dado para poder terminar el proyecto de fin de grado. Gracias a esta experiencia he podido conocer y trabajar con personas estupendas.

Gracias también a Aurora Moreno, la jefa, por su paciencia infinita y sus ánimos constantes. Gracias a Oli, por su gran ayuda y por su apoyo. Siempre dispuesta a ayudarnos en todo.

Gracias a Puri, por sus explicaciones y sus conversaciones. Gracias a Ramiro por su interés y por sus aportaciones.

Gracias a mi colega Ángel, compañero de fatigas durante este año (¡al final lo conseguimos!).

Gracias a mis amigos Pedro e Inma, porque siempre están dispuestos a ayudar en cualquier momento.

Y gracias a mi esposo Ángel, por su paciencia, por su ayuda y por su dominio de todas las herramientas informáticas. ¡Sin tu ayuda esto no hubiera sido posible!

Tabla de contenido

0. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	11
2.1. <i>Objetivo General</i>	<i>11</i>
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	<i>11</i>
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. <i>Diseño experimental</i>	<i>11</i>
3.2. <i>Medio de cultivo</i>	<i>12</i>
3.3. <i>Material vegetal y sistema de cultivo</i>	<i>14</i>
3.4. <i>Tratamientos</i>	<i>15</i>
3.5. <i>Análisis del medio y material vegetal</i>	<i>16</i>
3.5.1. <i>Análisis del medio</i>	<i>16</i>
3.5.2. <i>Análisis del material vegetal</i>	<i>17</i>
3.6. <i>Análisis estadístico</i>	<i>18</i>
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	30

0. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Tabla 1. Factores principales para el desarrollo del experimento

Tabla 2. Condiciones de las cámaras de cultivo

Tabla 3. Duración del ciclo completo (días)

Tabla 4. Efecto de los diferentes factores (ANOVA) estudiados en las variables del cultivo y del medio de crecimiento

Tabla 5. Efecto de los diferentes factores (ANOVA) para las dos fuentes de Zn utilizadas en el Zn extraíble por DTPA

Tabla 6. Efecto de los factores principales

Figura 1. Efecto de la interacción de la forma de adición de Zn en el medio y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en la concentración de Zn en raíz

Figura 2. Efecto de la interacción de la forma de adición de Zn en el medio y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en la concentración de Zn en la parte aérea

Figura 3. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la concentración de Zn en la parte aérea

Figura 4. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la absorción total de Zn en la parte aérea (Zn uptake total)

Figura 5. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación sobre la absorción total de P por las plantas (P uptake total)

Figura 6. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la acumulación de ácidos orgánicos (único detectable oxálico) en la rizosfera

Figura 7. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación en la actividad en la rizosfera

Figura 8. Efecto de la interacción entre la dosis de P y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en el Zn extraíble por DTPA en el suelo después del cultivo cuando el Zn se aplicó adsorbido a carbonatos.

Foto 1. (A) Proceso vernalización, (B) Semillero de perlita, (C-D) Plantas en semillero de perlita

Foto 2. (A) Baño de raíces para la inoculación de *Trichoderma asperellum*. B) Macetas preparadas para el trasplante

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la población mundial ha hecho que la agricultura de supervivencia que existía antiguamente de paso a una agricultura más intensiva e intensificada. El uso de fertilizantes ha sido imprescindible para mantener una producción de calidad que sigue en aumento. Sin embargo, el fósforo no es un elemento inagotable. En 2008 se da la llamada “crisis de fósforo”, que nos invita a pensar que a partir del 2030 la producción de fósforo irá decreciendo (Ulrich & Schnug, 2013). Esto hace necesario un uso sostenible del mismo. Es importante saber utilizar este recurso, siempre asegurando la producción de alimentos y respetando el medio ambiente.

El fósforo (P) es un macroelemento esencial para la vida de las plantas, encontrándose entre los dieciséis nutrientes esenciales para el desarrollo funcional de los cultivos. Forma parte de estructuras de la pared celular vegetal, es un constituyente de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y juega un papel muy importante en los procesos metabólicos que implican reacciones de transferencia de energía, como por ejemplo la fotosíntesis (Yang & Finnegan, 2010). Si existe una deficiencia de este elemento, ya sea por escasez en los suelos cultivados o porque, aún existiendo una cantidad suficiente, la planta es incapaz de asimilarlo, el desarrollo del cultivo se verá afectado. Su carencia puede limitar incluso el desarrollo de la planta (Ryan et al., 2012; Yang & Finnegan, 2010).

Gran parte del P aplicado al suelo como fertilizante se fija al mismo, reduciéndose de manera drástica su disponibilidad para el cultivo (Ulrich & Schnug, 2013). Del P aplicado como fertilizante, sólo una mínima parte (raramente superior al 25%) es aprovechado (Syers et al., 2008)

El P es muy abundante en la corteza terrestre, existiendo un reservorio de 4×10^{15} toneladas, aunque sólo el 0,1% está disponible para la planta a causa de su pobre solubilidad y su fijación en el suelo (Sharma et al., 2013). La principal fuente de P inorgánico procede de la descomposición y degradación de las rocas que contienen apatita aunque también se puede encontrar combinado con hierro y aluminio (Recena et al., 2017). Hay estudios que confirman que en más del 30% de la superficie agrícola del mundo existe una carencia de P en el suelo (Runge-Metzger, 1995).

Podemos encontrar el P en el suelo de varias maneras: disuelto en la solución del suelo (P asimilable, que es el único asimilable por la planta en forma de ión ortofosfato), fijado al complejo arcillo-húmico (P lábil o cambiante), como componente de la materia orgánica, precipitado o adsorbido a complejos de hierro o aluminio, precipitado como fosfato cálcico en suelos básicos (P poco asimilable) y, por último, formando parte de la roca madre (P no asimilable). El comportamiento del P en el suelo es complejo, debido a que el proceso de solubilización conlleva una serie de reacciones simultáneas e

instantáneas tales como la precipitación, adsorción (retención), desorción y óxido-reducción. La mineralización e inmovilización son procesos importantes del ciclo del fósforo en los suelos con alto contenido en materia orgánica (Black, 1968).

Pero no sólo el P puede llegar a ser un factor limitante en el desarrollo de la planta; la deficiencia de micronutrientes como el zinc (Zn), especialmente en suelos con pH alcalino, con bajo contenido de materia orgánica y alto contenido en CaCO_3 puede provocar baja producción en los cultivos (Rashid & Ryan, 2004). La deficiencia de Zn no es sólo un problema considerable en la agricultura, si no que también lo es en la salud humana, ya que muchas funciones fisiológicas del ser humano dependen del Zn (Henriques et al., 2012). De hecho, podemos encontrar complicaciones en niños, como retraso en el crecimiento, susceptibilidad a enfermedades infecciosas, deterioro en el desarrollo mental o aumento en la mortalidad (Brown et al., 2004). Junto con la deficiencia de la vitamina A, la falta de Zn es una de las mayores causas de mortalidad de niños menores de cinco años (Black et al., 2008). Los países donde la falta de Zn es un problema de salud pública, son aquellos donde los cereales son la base de la ingesta calórica diaria (Brown et al., 2004).

El Zn es uno de los ocho micronutrientes esenciales para el desarrollo de los cultivos. El nivel normal de Zn en el tejido foliar es de 15-60 mg/kg, y en el sustrato de cultivo, de 0,10-2,0 mg/kg. La deficiencia de Zn en los suelos es un problema global. Se estima que la mitad de los suelos cultivados contienen una cantidad de Zn reducida (Henriques et al., 2012). Este microelemento es el componente esencial en cientos de proteínas presentes en las plantas, aunque puede resultar tóxico si se encuentra en exceso (Broadley et al., 2007). El Zn también favorece la formación y fertilidad del polen, y ayuda en el mantenimiento de las membranas celulares lo que hace a la planta resistente frente a patógenos.

Las deficiencias de Zn se caracterizan por una necrosis en el ápice de la raíz, lo que conlleva una clorosis heterogénea, desarrollo de tonos bronceados, disminución de los entrenudos y reducción del tamaño de las hojas (Broadley et al., 2007). En conjunto, suministros deficientes de Zn pueden reducir significativamente el rendimiento de los cultivos y su calidad.

La mayor parte del Zn disponible en el suelo está asociado con la materia orgánica que se acumula en la capa superficial. Del contenido total de Zn, solo el que está en la solución del suelo es directamente utilizable por las plantas. El Zn es un elemento poco móvil, su disponibilidad va a depender de varios factores: pH (a pH ácidos la disponibilidad de Zn aumenta), contenido de materia orgánica (bajo nivel de materia orgánica o demasiado alto contenido de materia orgánica, por ejemplo, los suelos de turba disminuyen la disponibilidad), crecimiento restringido de las raíces (debido a capa dura, alta capa

freática), temperatura del suelo, condiciones anaeróbicas, suelos anegados, alto nivel de fósforo en el suelo (Maqueda et al., 2015).

La relación entre el P y el Zn es un ejemplo de antagonismo. Altas concentraciones de P causan disminución en la absorción de Zn, bien por la formación de precipitados en el suelo o por procesos metabólicos en las plantas que impiden la translocación de los nutrientes desde la raíz al resto de partes de la planta (Brown et al., 1962). Una alta disponibilidad de P para las plantas induce deficiencia de este micronutriente (Adriano & Murphy, 1970). De hecho cuando encontramos poca concentración de Zn en el suelo, aplicaciones de P agravan los síntomas de déficit de Zn, tanto en el suelo como en el cultivo (Ova et al., 2015).

Para solucionar el problema de salud que está provocando la falta de Zn en los granos de cereales se tiende a la biofortificación. Biofortificación es incrementar la concentración de un elemento o compuesto químico en la cosecha utilizada como alimento para mejorar su calidad alimentaria. Se puede conseguir aumentando la cantidad de Zn aplicado a cantidades superiores de los requeridos para obtener un máximo rendimiento en el cultivo, aumentando la concentración de Zn en las semillas (Peck et al., 1980). En el trigo se mejoró la cantidad de Zn en el grano aumentando la cantidad de Zn aplicado como fertilizante (Cakmak, 2008).

La problemática del agotamiento de la fuente de P, su acumulación en el medioambiente, junto con los altos costos energéticos y económicos de la fertilización, hace que se opte, cada vez más, por la utilización de vías alternativas, como la utilización de microorganismos con capacidad para solubilizar las reservas fosfóricas del suelo (Antoun, 2012; Zaidi et al., 2014). Los organismos involucrados en las transformaciones del P en el suelo incluyen bacterias, hongos, protozoos y algunos nematodos (Awasthi et al., 2011; Bünemann et al., 2011; Jones & Oburger, 2011; Oberson & Joner, 2005). En general, los microorganismos movilizan el P a través de procesos de mineralización de P orgánico y solubilización de P inorgánico (disolución o desorción de fosfato inorgánico).

El uso de microorganismos en agricultura ha estado relacionado con el control biológico de organismos fitopatógenos del suelo. Sin embargo, y con el objeto de conseguir una producción agrícola más sostenible, se puede aprovechar, asimismo, la capacidad de estos agentes de control biológico a la hora de movilizar P y otros nutrientes no asimilables de la rizosfera (Vassilev et al., 2006).

Estudios recientes indican que *Trichoderma asperellum* incrementa el contenido total de P en raíces de pepino, facilitando la absorción de P de difícil asimilación por las plantas (García-López et al., 2016).

Trichoderma asperellum no es la única especie que tiene esta capacidad de solubilizar P no soluble, habiéndose observado en otras especies de *Trichoderma* con anterioridad (Altomare et al., 1999). Es necesario, sin embargo, definir correctamente las características químicas del suelo ya que se ha demostrado que bajo determinadas condiciones, *Trichoderma asperellum* puede interferir en la absorción de determinados nutrientes como el Zn, al competir con las plantas por estos elementos (de Santiago et al., 2011). *Trichoderma* es un género de hongos que se encuentran en los suelos de todas las regiones del mundo y son importantes descomponedores de materiales leñosos y herbáceos. Producen enzimas capaces de degradar la pared celular (celulasas, quitinasas, glucanasa). Entre los efectos positivos de la inoculación de plantas con *Trichoderma* (Harman et al., 2004) se incluyen: a) control biológico de enfermedades causadas por patógenos en la raíz y en hoja; b) inducción de resistencia sistémica en las plantas; c) cambios en la composición de la microflora de las raíces; d) mejora la absorción de nutrientes, incluyendo, pero no limitado, al nitrógeno; e) mejora de la solubilidad de los nutrientes del suelo; f) mayor desarrollo de las raíces; g) aumento de la formación de pelos radiculares, y h) enraizamiento más profundo .

Bacillus subtilis es otro de los microorganismos con un doble uso en agricultura, ya que es un agente de control biológico en enfermedades de plantas (Lim & Kim, 2010) y además facilita la absorción de P y otros nutrientes (Orhan et al., 2006). La mejora en la absorción de P mediada por *B. subtilis* no sólo está basada en la solubilización de P, sino también en la mejora de la capacidad de la planta para su absorción (García-López et al., 2016).

Los ácidos orgánicos producidos por las raíces de las plantas o los microorganismos contribuyen a la movilización del P, Zn y otros nutrientes, ya que estos permiten la acidificación del suelo contribuyendo a solubilizar fosfatos de Ca, y facilitan la absorción de los cationes metálicos formando quelatos. Esta complejación contribuye también a la solubilización de fosfatos precipitados con iones metálicos como el Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} . Estos procesos contribuyen a que se transforme en P soluble y asimilable para la planta formas que no eran fácilmente asimilables (Corrales et al., 2014). Por otra parte, los ácidos orgánicos que excretan las raíces pueden ser utilizados como fuente de C por los microorganismos rizosféricos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

El objetivo general en este trabajo ha sido estudiar el efecto antagónico de asimilación P-Zn en plantas de trigo

2.2. Objetivos Específicos

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la influencia de la fuente de Zn (adsorbido a óxidos o a carbonatos) en la acumulación de Zn y P por las plantas.
- Analizar la influencia de dosis crecientes de fósforo en el medio de cultivo en la acumulación de Zn en las plantas
- Estudiar el efecto de distintos tratamientos en el medio de cultivo (aplicación de agentes de biocontrol y ácidos orgánicos) en la acumulación de Zn y P en la planta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

El diseño experimental se realizó con 4 repeticiones de cada tratamiento y tres factores: a) forma de Zn asociada al medio de cultivo, b) dosis de P e inoculación con microorganismos y c) ácido cítrico. Los factores y sus distintos niveles se describen en la Tabla 1. Cada repetición era una maceta con una planta de trigo. En total resultaron un total de 96 macetas.

FACTORES PRINCIPALES	
Tratamientos para favorecer la disponibilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicación de <i>Bacillus subtilis</i> • Aplicación de <i>Trichoderma asperellum</i> cepa T34 • Aplicación de ácidos orgánicos • Testigo
Formas de Zn asociadas al medio	<ul style="list-style-type: none"> • Zn asociado a óxidos • Zn asociado a carbonatos
Dosis de P (mg P/L Solución nutritiva)	<ul style="list-style-type: none"> • Dosis Baja 0,05 • Dosis media 0,3 • Dosis alta 3

Tabla 1. Factores principales para el desarrollo del experimento

El experimento se realizó en las cámaras de cultivo de la ETSIA con trigo blando, bajo condiciones determinadas de luz, temperatura y humedad. Se alternaron ciclos de día y de noche con las características descritas en la Tabla 2.

	Luz (H)	T (°C)	HR (%)	Radiación fotosintética ($\mu\text{mol m}^{-2}$)
Día	16	25	45	200
Noche	8	18	60	200

Tabla 2. Condiciones de las cámaras de cultivo

El Zn se dispuso en el medio de dos formas: asociado a carbonatos y a óxidos de hierro. Para ello, se partió de una mezcla de arena silíceo recubierta de óxidos de hierro y arena calcárea en una proporción, 2/3 y 1/3 respectivamente. Se le adsorbió 1 mg Zn/Kg medio (extraíble por DTPA) a los óxidos (en el medio con Zn asociado a los óxidos de hierro) y a los carbonatos (en el medio con Zn asociado a carbonatos).

Se aplicaron 3 dosis de P: (en forma de fosfato potásico K_2HPO_4 disuelto en la disolución nutritiva) una dosis baja (0,05 mg P/L solución nutritiva), una dosis media (0,3 mg P/L solución nutritiva) y una dosis alta (3 mg P/L solución nutritiva). Se aplicaron mediante riego, a través de una solución nutritiva Hoagland sin P, Zn y con el pH ajustado a 8,5 para simular condiciones de suelo calcáreo.

Los tratamientos para manipular la actividad microbiana en la rizosfera se realizaron en el momento del trasplante a maceta y fueron cuatro: aplicación de ácidos orgánicos, inoculación de *Bacillus subtilis*, Inóculo de *Trichoderma asperellum* y Testigo (sin inocular/aplicándole Ácidos orgánicos).

3.2. Medio de cultivo

Se prepararon 48 macetas con 335 g del *medio con Zn asociado a óxidos* y otras 48 con 335 g del *medio con Zn asociado a carbonatos*. Se utilizaron recipientes de plástico de 150 mm de altura y 55 mm de diámetro, con dos perforaciones en la base para facilitar el drenaje. Estaban recubiertos de aluminio para evitar la entrada de la luz.

La composición del medio fue la siguiente:

- Zn asociado a carbonatos: 2/3 Arena Silíceo recubierta de óxidos + 1/3 Arena calcárea con Zn
- Zn asociado a óxidos: 2/3 Arena Silíceo recubierta de óxidos con Zn + 1/3 Arena calcárea

Antes de realizar la mezcla con los dos tipos de arena se les realizó un tratamiento previo:

- *Arena silíce*

La arena silíce se lavó con abundante agua y carbonato sódico y se secó en la estufa de aire forzado a 60°C. Una vez seca, se pesaron 0,6 kg en un bote pyrex con 0,5 l de agua y se puso a hervir a 100°C, renovando el agua 4 o 5 veces hasta que la arena estuvo limpia. Tras este procedimiento, se lavó con agua desionizada y se secó en la estufa.

Después se añadió al bote de arena seca una disolución de 50 ml de agua con 4,6 g de nitrato de hierro a pH 6 (ajustado con hidróxido de potasio) y se mantuvo a 100°C durante una hora. Se mantuvo en movimiento para que los óxidos se distribuyeran de forma uniforme en la mezcla. Terminado ese proceso, se volvió a enjuagar la arena, cuidadosamente, para que los óxidos de hierro siguieran adheridos. Luego se secó en la estufa.

Para comprobar que el procedimiento se había hecho de forma correcta, se realizó una extracción con HCl 1 N y se determinó que la concentración de hierro se encontraba entre los 350-400 mg Fe/kg arena.

- *Arena calcárea*

La arena calcárea se limpió mediante dispersión y decantación. Con la ayuda de un cilindro de 30 cm se echó la arena mezclada con agua desionizada.

Para llevar a cabo la adsorción de Zn en la arena recubierta de óxidos se mantuvo en contacto la arena con una disolución de 1,2 mg Zn/L de solución nutritiva Hoagland libre de P, Zn y Fe a pH 8.5, en relación 1:10 p/v. La arena se mantuvo en la solución durante 24 horas a 25°C removiendo cada 6 h, hasta que se comprobó que la concentración de Zn en la matriz era de 0 mg Zn/L. Se enjuagó con abundante agua y se realizó una extracción con DTPA para comprobar que la concentración de Zn extraíble por este método era de aproximadamente 1 mg Zn/kg arena. La solución Hoagland contenía los siguientes ingredientes con la concentración expresada en mmol/L: MgSO₄ (2), Ca(NO₃)₂ (5), KNO₃ (5), KCl (0,05), Fe-EDDHA (0,02), H₃BO₃ (0,024), MnCl₂ (0,0023), CuSO₄ (0,0005), ZnSO₄ (0,002), and H₂MoO₄ (0,0005).

Con la arena calcárea se procedió de igual manera, en este caso la concentración fue de 5 mg Zn/L de solución nutritiva Hoagland libre de P, Zn y Fe a pH 8.5, en relación 1:10 p/v También se realizó un a extracción con DTPA para comprobar que la concentración de Zn extraíble era aproximadamente de 1 mg Zn/kg arena.

3.3. Material vegetal y sistema de cultivo

Se realiza un ensayo experimental bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad en una cámara de cultivo de la E.T.S.I.A. con trigo blando (*Triticum aestivum*).

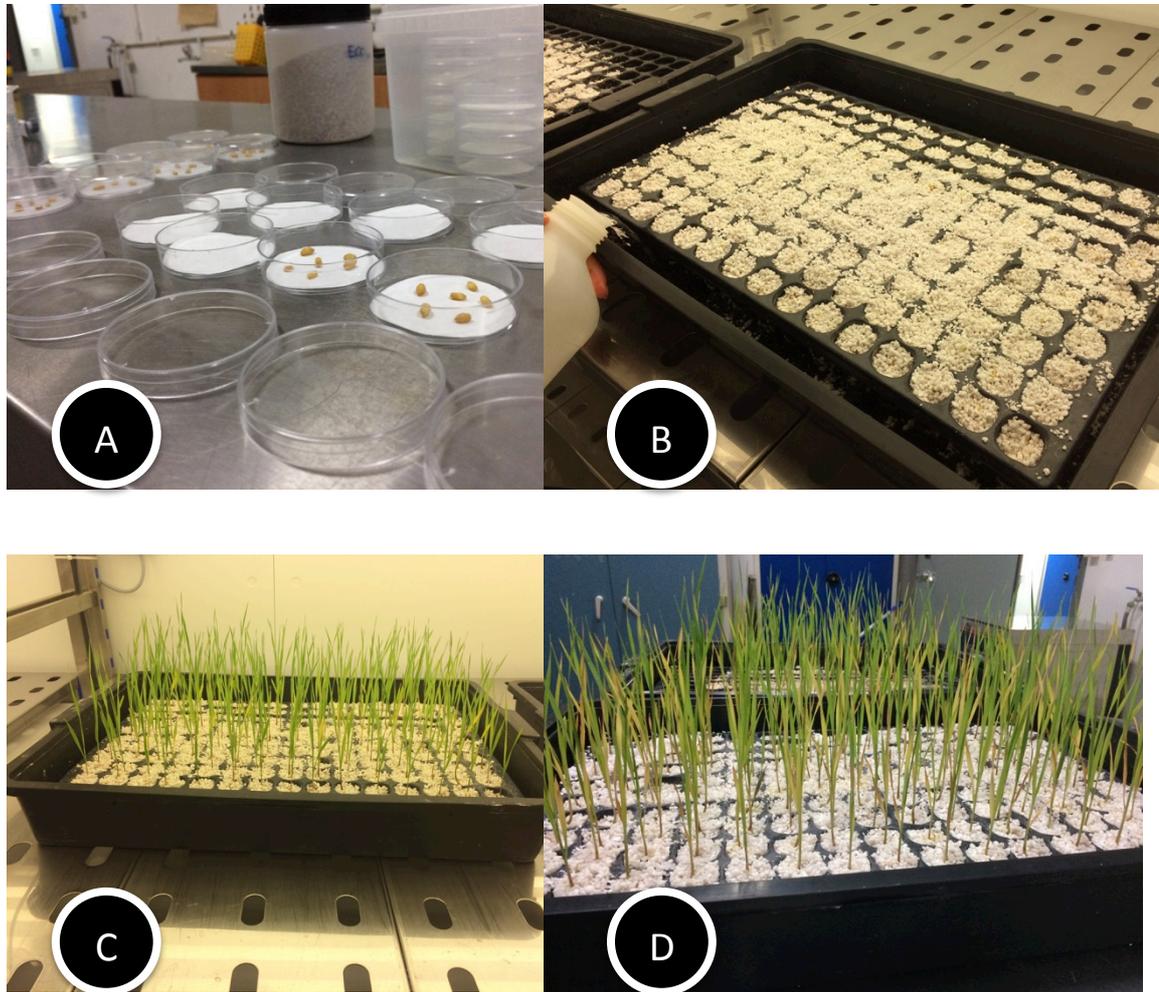


Foto 1. (A) Proceso vernalización, (B) Semillero de perlita, (C-D) Plantas en semillero de perlita

Las semillas se sometieron a un proceso de vernalización. Se sumergieron en NaCl 5% durante un minuto y luego se enjuagaron con agua desionizada. Se agruparon las semillas de seis en seis en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua millipore y se pusieron en un frigorífico a 6°C. Tras la germinación se pasaron a un semillero con perlita. El semillero se regaba con agua desionizada en días alternos. Cuando la planta alcanzó la fase de desarrollo Z1.2 según la escala decimal Zadoks (ZADOKS et al., 1974) se trasplantaron a una maceta. Las macetas se situaron en la cámara de cultivo, según las condiciones que se citaron en la Tabla 2.

	Germinación placa Petri	Semillero	Trasplante en maceta	Ciclo completo
Días	8	18	52	78

Tabla 3. Duración del ciclo completo (días)

Cada una de las macetas recibieron un total de 340 ml solución nutritiva Hoagland libre de P, Zn y Fe a pH 8.5, y 70 ml de agua desionizada.

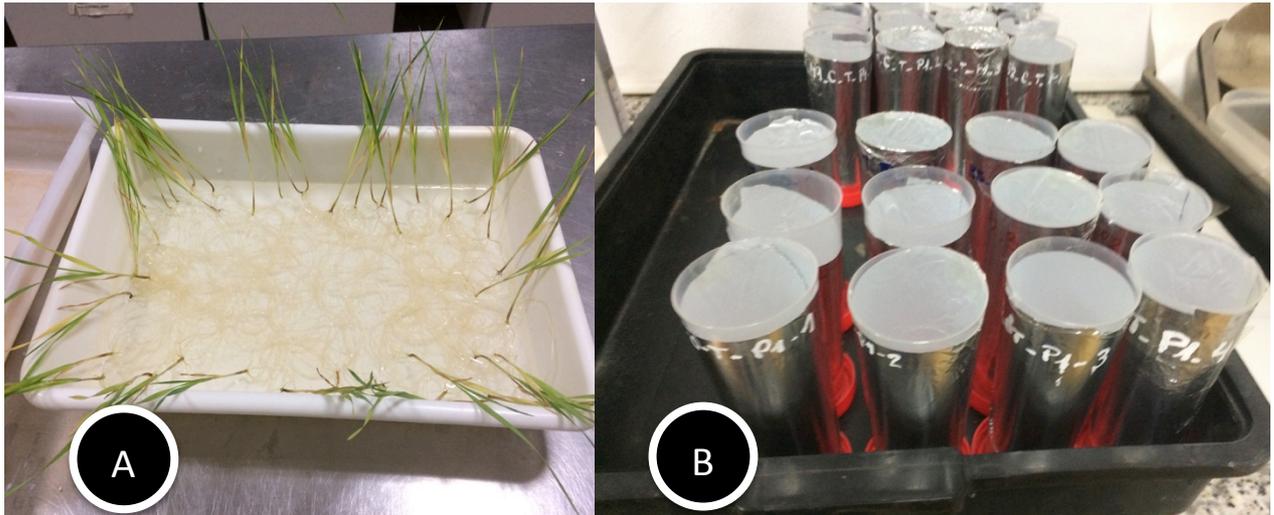


Foto 2. (A) Baño de raíces para la inoculación de *Trichoderma asperellum*. (B) Macetas preparadas para el trasplante

3.4. Tratamientos

- Inóculo de *Bacillus subtilis*

En el momento del trasplante en maceta se aplicaron $2 \cdot 10^4$ CFU g^{-1} suelo. Se aplicó en cada maceta 20 ml de una suspensión de *Bacillus subtilis* (García-López et al., 2016).

- Inóculo de *Trichoderma asperellum* cepa T34

En el momento del trasplante también se inoculó con *Trichoderma*, se sumergieron las raíces de las plántulas en una suspensión de 10^3 conidias mL^{-1} agua. Posteriormente se aplicaron 10^4 conidias g^{-1} a partir de una suspensión con $1,5 \cdot 10^5$ conidias mL^{-1} agua en diferentes puntos de la superficie de la maceta (García-López et al., 2016).

- Ácidos orgánicos

Justo antes del trasplante, se aplicó ácido cítrico en el medio. Se aplicaron 200 mg C kg medio de cultivo⁻¹.

3.5. Análisis del medio y material vegetal

Tras el experimento se analizó pH y CE en el medio, actividades enzimáticas (β -Glucosidasa y fosfatasa), sideróforos, ácidos orgánicos, plating para determinar el número de unidades formadoras de colonia (CFU) en el medio, Fe y Zn extraíble por DTPA, P Olsen, biomasa seca y uptake de la planta (Zn y P).

3.5.1. Análisis del medio

El medio de cultivo se guardó en tubos falcon para su posterior análisis, conservado en el frigorífico. Se realizaron los siguientes determinaciones:

- pH y CE:

Se tomó una relación 1:5 (p/v) de suelo y agua. Se agitó durante 30 minutos y se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm. Tras extraer una alícuota de 10 ml se procedió a leer la CE y el pH de cada muestra.

- Actividades Enzimáticas

- Fosfatasa: Se siguió el procedimiento de Tabatabai y Bremmer (1969) descrito por Eivazi y Tabatai (1988). Se pesaron 2 g de suelo (control y dos repeticiones de cada muestra) y se le añadieron 4 ml de buffer universal (MUB) y 1 ml de p-nitrophenilfosfato (PNP). La muestra se agitó y se dejó incubar al baño maría durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se paró la reacción añadiendo 1 ml de Ca Cl₂ 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M. Posteriormente se midió mediante espectrofotometría visible a 410 nm. Se determinó la cantidad de p-nitrophenilfosfato (PNP).
- β -Glucosidasa: Se siguió el procedimiento de Eivazi y Tabatai (1988). Se pesaron 2 g de suelo (testigo y dos repeticiones de cada muestra) y se le añadieron 4 ml de buffer universal (MUB) y 1 ml de p-nitrophenyl- β -D-glucoside (PNG). La muestra se agitó y se dejó incubar al baño maría durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se paró la reacción añadiendo 1 ml de Ca Cl₂ 0,5 M y 4 ml de THAM a pH 12. Posteriormente se midió mediante

espectrofotometría visible. Se determinó la cantidad de p-nitrophenyl-β-D-glucoside (PNG).

- Sideróforos

Se realizó una extracción con NaOH 0,1 M, en una relación 1:1 de p/v . Se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm y se filtró. Se utilizaron 2 ml para analizar sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987).

- Ácidos orgánicos

Se realizó una extracción con NaOH 0,1 M, en una relación 1:1 p/v. Se pesaron 5 g de medio rizosférico y se le añadieron 5 ml de NaOH 0,1 M. Se agitó a 160 rpm durante 90 minutos, se centrifugó durante 10 minutos a 2500 rpm y se ultracentrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Tras ese proceso se obtuvo una alícuota que se filtró (filtro de 0,25 mm) y se midió con HPLC (Gao et al., 2012).

- Plating

Se realizó un recuento de *Trichoderma asperellum* cepa T34 y *Bacillus subtilis* en placa (García-López et al., 2016). Se realizó una extracción con Na-pirofosfato en 5 g de suelo húmedo rizosférico, se diluyó con agar agua hasta la concentración de suelo óptima y se sembró mediante arrastre en placa Petri. Se utilizó un medio selectivo para cada uno de los microorganismos como describe Borrero et al. (2012). Las unidades formadoras de colonias (CFU) se contaron 7 días después de la siembra y se expresaron como CFU por gramo de medio de cultivo

- DTPA

Se analizó el contenido de Fe y Zn mediante una extracción 1:4 p/v en DTPA/TEA/CaCl₂ con un pH ajustado a 7,3 (Lindsay & Norvell, 1978). La extracción se realiza durante 2 horas en un agitador de vaivén a 120 rpm y posteriormente se centrifuga a 2500 rpm. De ahí se obtiene el extracto para hacer las determinaciones de Fe y Zn con absorción atómica.

- P Olsen

Mediante una extracción con 2 g de suelo y 40 ml de extractante, NaHCO₃ 0,5 M a pH 8,5, (Olsen et al., 1954) determinándose la concentración de P en el extracto según Murphy et al. (1962).

3.5.2. Análisis del material vegetal

Se levantó el ensayo y se separó la parte aérea de la raíz. La raíz se lavó con agua desionizada y se introdujo en un baño de ultrasonido durante 1 minuto. Tras este proceso, se volvió a lavar con agua desionizada y se puso a secar, para posteriormente ser pesada. La parte aérea se guardó en sobres debidamente identificados en la estufa para su posterior procesado. Tras el secado, se pesó y se picó la raíz y la parte aérea de cada una por separado. Se calcinó en la mufla durante 8 horas a 550 °C. Las cenizas se llevaron a ebullición con 10 ml de HCl 1 N durante 15 minutos. Tras este proceso se volvió a llevar hasta un volumen de 10 ml con agua desionizada, y así ajustar la concentración en 1 N de HCl. En la disolución resultante se determinaron Fe y Zn mediante absorción atómica, y la concentración de fósforo molibdato reactivo (MRP) a través de colorimetría, según Murphy et al. (1962).

3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1. Se realizó un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA). Previamente se comprobó la normalidad de los datos (test de Smirnov-Kolmogorov) y de homogeneidad de la varianza (test de Levene). Si no se cumplían alguno de ellos, los datos se transformaron para cumplir con estas premisas (transformaciones logarítmicas o potencial). Se realizó un análisis con los tres factores definidos en el diseño experimental, excepto para el Zn extraíble por DTPA después del cultivo ya que tenían una distribución bimodal. Las medias se compararon según el test de LSD para un nivel de probabilidad del 5%. Cuando la interacción entre factores era significativa, el efecto de los factores principales no puede ser estudiado, ya que el efecto de un factor depende del nivel del otro. En estos casos, la interacción se estudió mediante la gráfica de interacción.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los factores estudiados (ANOVA) sobre las variables medidas en planta y en medio de cultivo se presentan de manera global en la Tabla 4. Hubo un efecto significativo de la forma de Zn aplicada en el medio y del tratamiento con microorganismos/ácidos orgánicos en la materia seca acumulada en la parte aérea y en la materia seca total. El tratamiento microorganismo/ácidos orgánico afectó significativamente la absorción total de Zn y la actividad β -glucosidasa. La dosis de P tuvo un efecto significativo en las actividades enzimáticas estudiadas y en el pH en la rizosfera tras el cultivo (Tabla 4).

Cuando se analizó el Zn extraíble por DTPA por separado para ambas formas de aplicación de este nutriente, hubo una interacción significativa entre tratamiento y dosis de P (Tabla 5). Hubo interacciones significativas entre la forma de Zn en el medio y el tratamiento en las concentraciones de

Zn en raíz y tallo, en la absorción total de P y en la actividad fosfatasa en el medio (Tabla 4). Por otra parte, también fue significativa la interacción entre la forma de Zn y la dosis de P en la concentración de Zn en tallos, en la absorción total de Zn y en los ácidos orgánicos en la rizosfera.

La mayor producción de materia seca (aérea y total) se produjo cuando el Zn está asociado a los óxidos (Tabla 6). También podemos observar que la cantidad de biomasa y la absorción total de Zn es significativamente menor con la aplicación de ácidos orgánicos que con la inoculación con microorganismos. Por el contrario, la mayor actividad β -glucosidasa se observó cuando se aplicaron ácidos orgánicos. Esto pone de manifiesto que la adición de esta fuente de C incrementó la actividad microbiana. Este incremento de la actividad microbiana no parece traducirse en una mejora en la nutrición de la planta, quizás poniendo de manifiesto cierto efecto de competencia. Las dosis crecientes de P incrementaron la absorción de P por la planta y las actividades enzimáticas (Tabla 6). Esto último puede deberse a un mayor desarrollo radicular que puede provocar una mayor exudación de compuestos orgánicos en la rizosfera y una mayor actividad microbiana. Parte de la actividad fosfatasa puede deberse a la propia raíz (García-López et al. 2015).

El efecto de los tratamientos en la concentración de Zn en la planta, tanto en raíz (Figura 1), como en la parte aérea (Figura 2), varió dependiendo de las formas en las que el Zn está presente en el medio, como pone de manifiesto la interacción significativa observada (Tabla 4). En general, todos los tratamientos con microorganismos o ácidos orgánicos dieron peores resultados que el testigo, a excepción de los ácidos orgánicos en la concentración de Zn en parte aérea cuando este nutriente estaba asociado a carbonatos. Cuando el Zn estaba presente asociado a óxidos, el efecto de la aplicación de ácidos orgánicos fue muy negativo en comparación al testigo, reduciendo su concentración en la parte aérea en un 40 % (Figura 2). Esto puede poner de manifiesto, que si en bien en los medios calcáreos puede haber cierto efecto beneficioso por promover la disolución de Zn asociado a carbonatos, cuando se aplica el Zn como óxidos no hay beneficio alguno. En este último caso, quizás el efecto que prima es un incremento de actividad microbiana y probable competencia por el Zn con el cultivo. La mayor concentración de Zn en la raíz cuando este está asociado a carbonatos puede ser la consecuencia del menor desarrollo que tienen las plantas en los medios en los que el Zn se aporta asociado a carbonatos. El menor desarrollo puede dar lugar a concentraciones mayores por una menor dilución del nutriente adsorbido. Sin embargo, en cuanto a la acumulación de Zn en la parte aérea ocurre a la inversa que en la raíz. La concentración de Zn en la parte aérea es mayor cuando el Zn está asociado a los óxidos en vez de a carbonatos (Figura 2.). Por tanto, el efecto no puede explicarse como una dilución. La forma en la que se aplica el Zn está condicionando

probablemente de diferente manera las acumulaciones en raíz y en parte aérea. Cuando se aplica en asociado a óxidos, se favorecen mayores concentraciones en parte aérea y menores concentraciones en raíz.

El efecto de la dosis de P en la concentración de Zn en la parte aérea dependió de la forma en la que el Zn estaba presente en el medio (Figuras 3 y 4) como revela la interacción significativa observada (Tabla 1). La concentración de Zn en tallos disminuye con las dosis crecientes de P cuando el Zn estaba asociado a carbonatos, mientras que el efecto contrario se observa cuando el Zn está asociado a óxidos (Figura 3). En el Zn total en planta, el efecto negativo a bajas dosis no es tan evidente como el descrito antes, pero las dos dosis más altas de P dan lugar a mayores extracciones de Zn que la más baja (Figura 4). Esto pone de manifiesto que el posible antagonismo es más evidente cuando el Zn está asociado a carbonatos, mientras que el P puede beneficiar la acumulación de Zn si este está asociado a óxidos. Este efecto beneficioso puede deberse a que el P puede competir por lugares de adsorción, promoviendo la liberación de Zn adsorbido en los óxidos.

Fuente de variación	Biomasa ¹	DM parte aérea ¹	Concentración Zn Raíz ²	Concentración Zn tallos	Absorción total de Zn ²	Absorción total de P ₂	Ácidos orgánicos	β-Glucosidasa ¹	Fosfatasa ¹	pH ³	Zn DTPA ³
	Valor de P										
Forma Zn	0.0000	0.0000	0.0000	0.0039	0.0000	0.4570	0.9778	0.6944	0.0000	0.0003	0.0000
Tratamiento	0.0019	0.0049	0.0125	0.3026	0.0018	0.0007	0.8083	0.0003	0.0000	0.7963	0.9798
Dosis P	0.3637	0.3617	0.1170	0.1412	0.1857	0.0234	0.0000	0.0006	0.0455	0.0146	0.9204
Forma Zn*Tratamiento	0.0522	0.1059	0.0374	0.0447	0.1034	0.0122	0.0630	0.8193	0.0234		
Forma Zn*Dosis P	0.4772	0.6541	0.0795	0.0050	0.0223	0.2869	0.0020	0.0969	0.1055		
Tratamiento*Dosis P	0.4839	0.4934	0.3649	0.5645	0.2438	0.3018	0.0912	0.4351	0.9599		
Forma Zn*Tratamiento*Dosis P	0.3400	0.2463	0.1973	0.0476	0.3947	0.1630	0.0145	0.6944	0.8217		

Ácidos orgánicos, pH, en rizosfera

¹ Transformación logarítmica (base 10) para cumplir requisitos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene)

² Transformación $X^{-0.8}$ para la concentración de Zn en raíz; $X^{0.14}$ para absorción total de Zn, $X^{0.19}$ para absorción total de P

³ Test de Kruskal-Wallis para factores principales ya que no se ajusta a normalidad; no se pueden estudiar interacciones

Tabla 4. Efecto de los diferentes factores (ANOVA) estudiados en las variables del cultivo y del medio de crecimiento

Fuente de variación	Zn en carbonatos	Zn en óxidos
Tratamiento	0.0173	0.0650
Dosis P	0.0643	0.3323
Tratamiento*Dosis P	0.0183	0.0926

Tabla 5. Efecto de los diferentes factores (ANOVA) para las dos fuentes de Zn utilizadas en el Zn extraíble por DTPA

		Biomasa total (g)	Biomasa aérea (g)	Absorción total Zn (mg Zn/kg suelo)	Absorción total P (mg P/kg suelo)	β -Glucosidasa (μ g PNG/g suelo)	Fosfatasa (μ g PNP/g suelo)	pH ¹
Forma Zn	Carbonato	0.10B	0.07B					
	Óxido	0.17A	0.12A					
Tratamiento	Ácidos Orgánicos	0.12b	0.08b	5.8b		1.43a		
	Testigo	0.14a	0.10ab	7.9a		0.60b		
	Trichoderma	0.14a	0.10a	8.5a		0.51b		
	Bacillus	0,15a	0.11a	8.7a		0.87ab		
Dosis P	P1				174 β	0.35 β	26 β	8.05 α
	P2				210 α β	0.52 β	34 β	7.99 β
	P3				246 α	1.70 α	54 α	8.00 β

4.1.1. El efecto de los factores principales no se puede discutir si están implicados en interacciones significativas

4.1.2. Letras mayúsculas diferentes indican medias significativamente distintas para formas de Zn; letras minúsculas distintas indican medias significativamente distintas para Tratamiento; letras griegas diferentes indican medias significativamente distintas para las dosis de P. Test LSD P < 0.05

¹ Medianas significativamente distintas

Tabla 6. Efecto de los factores principales

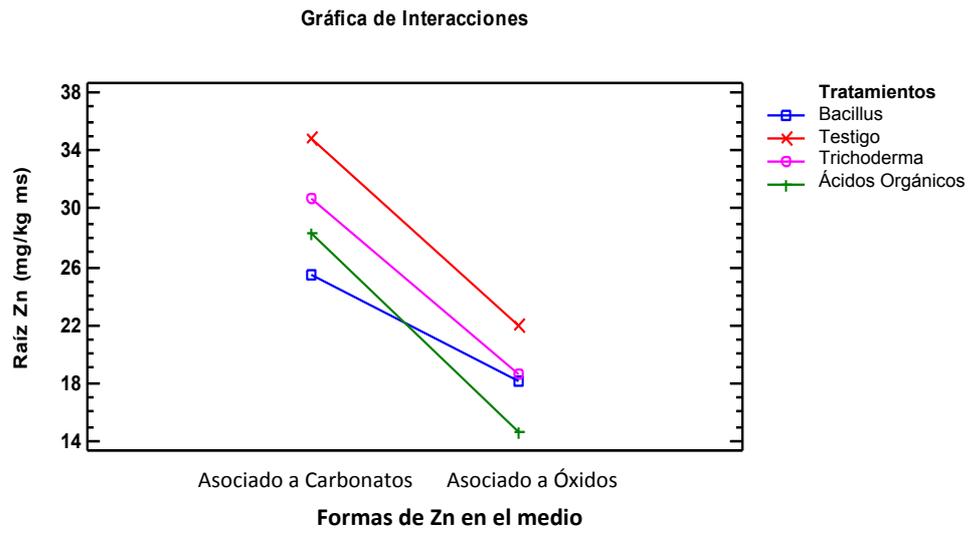


Figura 1. Efecto de la interacción de la forma de adición de Zn en el medio y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en la concentración de Zn en raíz

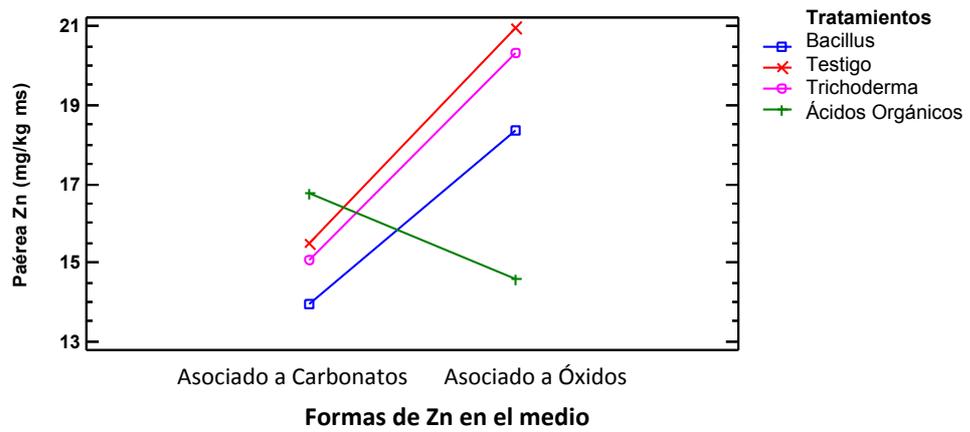


Figura 2. Efecto de la interacción de la forma de adición de Zn en el medio y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en la concentración de Zn en la parte aérea

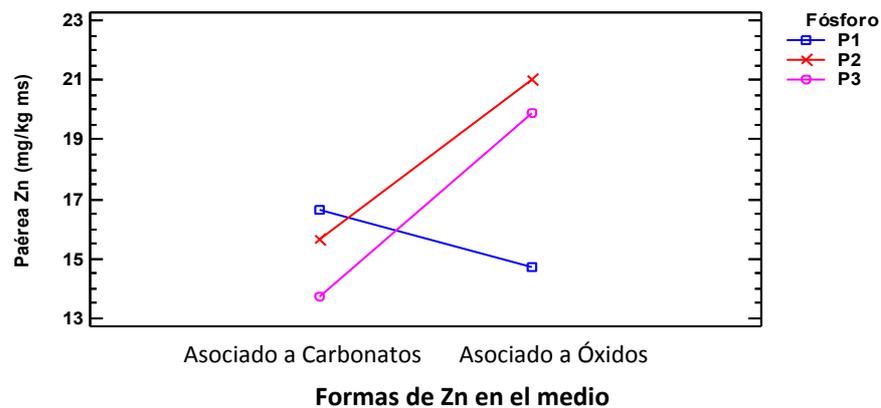


Figura 3. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la concentración de Zn en la parte aérea

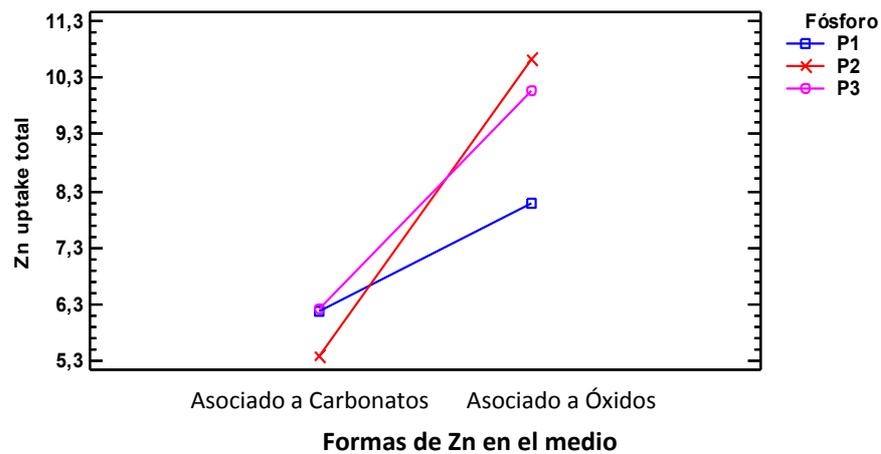


Figura 4. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la absorción total de Zn en la parte aérea (Zn uptake total)

El P total que absorben las plantas también va a estar influenciado por la interacción entre la forma de adición de Zn al medio y los tratamientos de microorganismos/ácidos orgánicos que hemos aplicado (Tabla 4). Los dos microorganismos probados dan lugar a una acumulación de P total en planta 2.5 veces mayor que el testigo cuando el Zn se aplicó asociado a carbonatos.

Por otra parte, cuando el Zn se aplicó asociado a óxidos, el testigo fue el que dio los mejores resultados, con acumulaciones de P total un 20 % superiores a los microorganismos y casi 3 veces superior a la aplicación de ácidos orgánicos (Figura 5). Los dos microorganismos probados dan lugar a una mayor acumulación de P en la planta que los otros tratamientos sólo cuando el Zn se aportó asociado a carbonatos. Por tanto, el potencial efecto beneficioso de estos dos microorganismos sobre la nutrición de P de la planta parece condicionado por la forma en la que está el Zn en el medio de cultivo. El medio calcáreo da lugar a menores acumulaciones de Zn en la planta y también era donde parecía haber un efecto antagónico con el P más evidente. En estas condiciones, puede que el efecto de ambos microorganismos sea positivo sobre la acumulación total de P en la planta.

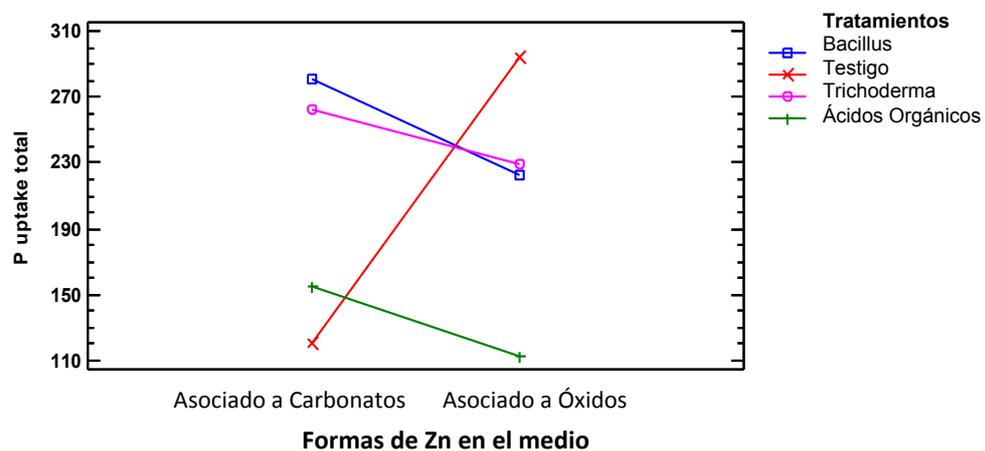


Figura 5. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación sobre la absorción total de P por las plantas (P uptake total)

Encontramos también una interacción significativa entre la forma de adición de Zn en el medio y las dosis de P en la acumulación de ácidos orgánicos en la rizosfera, como revela la Tabla 4. Cuando el Zn se aportó asociado a óxidos, no hubo diferencias significativas en la concentración de ácido oxálico en la rizosfera. Cuando el Zn se aportó asociado a carbonatos, esta concentración se incrementó con dosis crecientes de P. Los ácidos orgánicos pueden estar producidos por la raíz o por los microorganismos. De hecho, la actividad β -glucosidasa

aumenta con las dosis crecientes de P. El medio con Zn asociado a carbonatos parece más limitante para el cultivo, y la adición de dosis crecientes de P puede contribuir a un mayor desarrollo radicular y a mayor actividad microbiana que expliquen la mayor exudación de ácidos orgánicos (Figura 6)

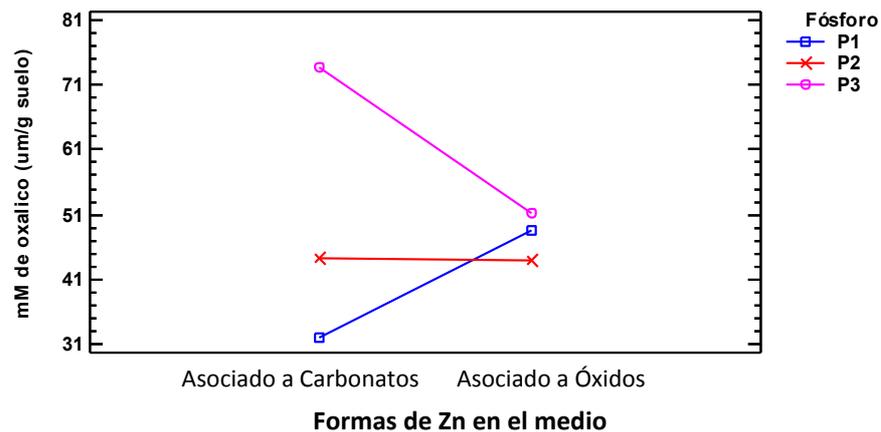


Figura 6. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y la dosis de P en la acumulación de ácidos orgánicos (único detectable oxálico) en la rizosfera

Por otra parte, podemos observar en la Figura 7 como la aplicación de ácidos orgánicos incrementa la actividad fosfatasa en el medio, independientemente de la forma en la que se adiciona el Zn (Tabla 6). El ácido cítrico sirve de fuente de C para los microorganismos y como se ha comentado anteriormente incrementa la actividad microbiana. La actividad fosfatasa debe estar asociada en parte a los microorganismos, lo que explica este efecto. Para el resto de los tratamientos, no hay diferencias cuando el Zn se aplicó asociado a carbonatos, mientras que el *Bacillus* fue el más efectivo cuando este nutriente se aportó asociado a óxidos. Estos efectos ponen de manifiesto como la producción de enzimas hidrolíticas que contribuyen a mejorar la acumulación de P en la planta está afectada por tratamientos que afectan la actividad microbiana en el medio de cultivo. Sin embargo, este efecto depende de la forma dominante de Zn en el medio. En general, cuando el Zn está asociado a óxidos hay un mayor desarrollo de las plantas, lo que puede dar lugar a más exudados radiculares y más actividad microbiana. Esto puede explicar las diferencias entre testigo y tratamientos con inoculación entre las dos formas de Zn presentes en el medio. Cuando se aporta cítrico, las diferencias

entre las dos formas de Zn son menores, probablemente porque la aplicación de una fuente de C difumina el efecto de la mayor exudación radicular en los medios que tienen el Zn asociado a óxidos.

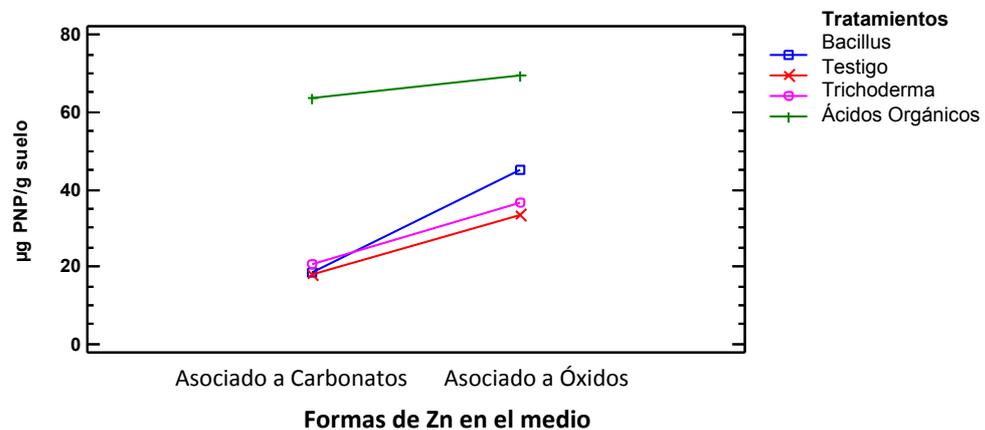


Figura 7. Efecto de la interacción entre la forma de adición de Zn y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación en la actividad en la rizosfera

La medida de Zn extraíble por DTPA después del cultivo puede poner de manifiesto el potencial efecto movilizador de los tratamientos. Como podemos comprobar en la Figura 8, con la dosis baja de P, el *Bacillus* es el mejor tratamiento incrementando el Zn extraíble por DTPA. En este caso, el testigo da resultados que no son muy distintos de la aplicación de ácidos orgánicos o Trichoderma. Sin embargo, con la dosis alta de P, todos los tratamientos que afectan la actividad microbiana en el medio dan mejores resultados que el testigo. Esto pone de manifiesto un diferente efecto movilizador dependiendo de la dosis de P aplicada como fertilizante. Los efectos con la inoculación o con la aplicación de una fuente de C para los organismos son más evidentes con la dosis más alta de P. Esto indica un potencial beneficio de la inoculación con microorganismos o de la aplicación de ácidos orgánicos incrementando el Zn disponible en el suelo cuando el antagonismo con el P puede verse más favorecido con la aplicación de dosis altas de fertilizante.

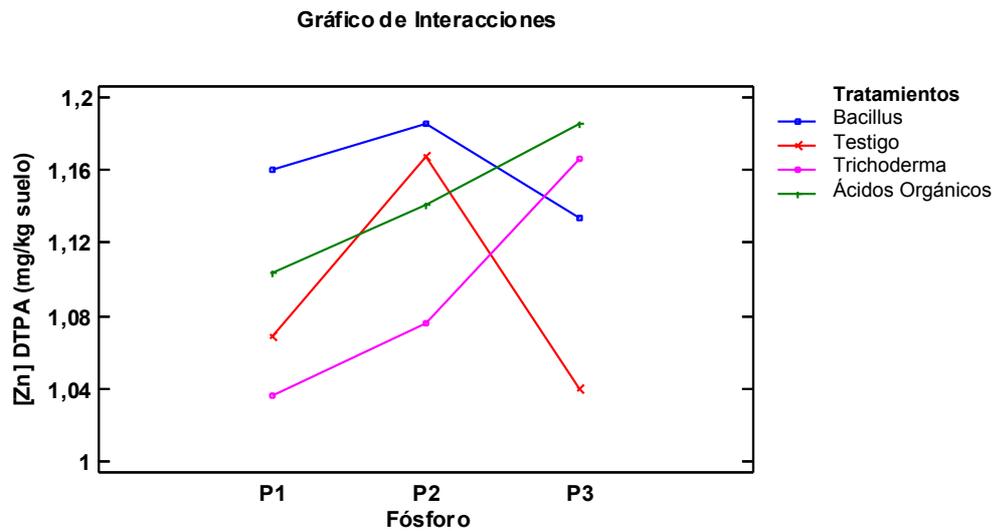


Figura 8. Efecto de la interacción entre la dosis de P y los tratamientos de ácido cítrico e inoculación con microorganismos en el Zn extraíble por DTPA en el suelo después del cultivo cuando el Zn se aplicó adsorbido a carbonatos.

5. CONCLUSIONES

En general, cuando el Zn se encuentra asociado a óxidos, la planta se desarrolla más y por lo tanto se obtiene mayor producción de materia seca. Aumentan los exudados radiculares, y encontramos más actividad microbiana. También se concentra más Zn en la parte aérea y el antagonismo con el P no es tan evidente e incluso la adición de P puede mejorar la acumulación de Zn.

El medio donde el Zn se encuentra asociado a carbonatos es más limitante para el cultivo, pero con la fertilización fosfatada adecuada mejora la actividad microbiana y el desarrollo radicular.

La aplicación de ácidos orgánicos dio lugar a una menor cantidad de biomasa y menor concentración de Zn total que la inoculación con microorganismos. Sin embargo, los ácidos orgánicos aumentaron la actividad microbiana, debido a la adición de C. De hecho, aumenta la actividad de la fosfatasa, independientemente de cómo esté adicionado el Zn al medio.

Dosis crecientes de P hicieron que la planta tomara más P, debido a un mayor desarrollo radicular, y también aumentó la actividad enzimática. También la concentración de Zn en la

parte aérea aumentó cuando el Zn estaba asociado a óxidos, mientras que fue menor en el caso del Zn asociado a carbonatos.

Los tratamientos con Bacillus y Trichoderma mejoran la absorción de P total por las plantas cuando el Zn está asociado a carbonatos.

En el medio donde el Zn está asociado a carbonatos, Bacillus es el mejor tratamiento con dosis bajas de P aumentando la cantidad de Zn extraíble por DTPA. Sin embargo, con dosis altas de P, tanto Bacillus, Trichoderma como la adición de ácidos orgánicos dan mejores resultados que el testigo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adriano, D. C., & Murphy, L. S. (1970). Effects of Ammonium Polyphosphates on Yield¹ and Chemical Composition of Irrigated Corn. *Agronomy Journal*, 62(5), 561–567.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. In *Procedia Engineering* (Vol. 46, pp. 62–67). <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.09.446>
- Awasthi, R., Tewari, R., & Nayyar, H. (2011). Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils : Effects on Growth and Physiology of Crops. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*, 2(12), 484–503.
- Black, C. A. (1968). Soil-plant relationships. *Soil-Plant Relationships.*, (2nd ed.).
- Black, R. E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., de Onis, M., Ezzati, M., ... Maternal and Child Undernutrition Study Group. (2008). Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet (London, England)*, 371(9608), 243–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61690-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61690-0)
- Borrero, C., Trillas, M. I., Delgado, A., & Avilés, M. (2012). Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of Fusarium wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathology*, 61(1), 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02490.x>
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>
- Brown, J. C., & Tiffin, L. O. (1962). Zinc deficiency and iron chlorosis dependent on the plant species and nutrient-element balance in Tulare clay. *Agronomy Journal*, 54(4), 356–358.
- Brown, K. H., Rivera, J. A., Bhutta, Z., Gibson, R. S., King, J. C., Lonnerdal, B., ... Hotz, C. (2004). International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutrition Bulletin*, 25(1 Suppl 2), S99-203.

- Bünemann, E. K., Prusisz, B., & Ehlers, K. (2011). Characterization of Phosphorus Forms in Soil Microorganisms. In E. Bünemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling* (pp. 37–57). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_2
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3>
- Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos : una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67–79.
- de Santiago, A., Quintero, J. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron, copper, manganese, and zinc uptake by wheat grown on a calcareous medium. *Plant and Soil*, 342(1–2), 97–104. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0670-1>
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601–606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Gao, Z., Shao#, J., Sun, H., Zhong, W., Zhuang, W., & Zhang, Z. (2012). Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese Apricot fruits. *African Journal of Agricultural Research*, 7(35), 4911–4918. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1347>
- García-López, A. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2016). Effect of various microorganisms on phosphorus uptake from insoluble Ca-phosphates by cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(4), 454–465. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500024>
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., & Chen, J. (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147–153. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.147>
- Henriques, A. R., Chalfun-Junior, A., & Aarts, M. (2012). Strategies to increase zinc deficiency tolerance and homeostasis in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000100002>

- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In E. Bünemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling* (pp. 169–198). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_7
- Lim, J. H., & Kim, S. D. (2010). Biocontrol of phytophthora blight of red pepper caused by phytophthora capsici using bacillus subtilis AH18 and B. licheniformis K11 formulations. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 53(6), 766–773. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.116>
- Lindsay, W. L., & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper¹. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421–428. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x>
- Maqueda, C., Morillo, E., Lopez, R., Undabeytia, T., & Cabrera, F. (2015). Influence of organic amendments on Fe, Cu, Mn, and Zn availability and clay minerals of different soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(5), 599–613. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.946409>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27(C), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Oberson, A., & Joner, E. J. (2005). Microbial turnover of phosphorus in soil. In *Organic phosphorus in the environment* (pp. 133–164). Wallingford: CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851998220.0133>
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F., & Dean, L. (1954). Estimation of Available Phosphorus in Soil by Extraction with sodium Bicarbonate. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.09.002>

- Ova, E. A., Kutman, U. B., Ozturk, L., & Cakmak, I. (2015). High phosphorus supply reduced zinc concentration of wheat in native soil but not in autoclaved soil or nutrient solution. *Plant and Soil*, 393(1), 147–162. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2483-8>
- Peck, N. H., Grunes, D. L., Welch, R. M., & MacDonald, G. E. (1980). Nutritional quality of vegetable crops as affected by phosphorus and zinc fertilizers. *Agronomy Journal*, 72(3), 528–534.
- Rashid, A., & Ryan, J. (2004). Micronutrient Constraints to Crop Production in Soils with Mediterranean-type Characteristics: A Review. *Journal of Plant Nutrition*, 27(6), 959–975. <https://doi.org/10.1081/PLN-120037530>
- Recena, R., Díaz, I., & Delgado, A. (2017). Estimation of total plant available phosphorus in representative soils from Mediterranean areas. *Geoderma*, 297, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.02.016>
- Runge-Metzger, A. (1995). Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security. *SCOPE 54 – Phosphorus in the Global Environment – Transfers, Cycles and Management*, 462.
- Ryan, J., Ibrikci, H., Delgado, A., Torrent, J., Sommer, R., & Rashid, A. (2012). *Significance of Phosphorus for Agriculture and the Environment in the West Asia and North Africa Region*. *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 114). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394275-3.00004-3>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Syers, J.K., Johnston, A.E. and Curtin, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 18. FAO, Rome. 108pp. *FAO Fertilizer and Plant*

Nutrition Bulletin 18. FAO. <https://doi.org/10.1017/S0014479708007138>

Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)

Ulrich, A., & Schnug, E. (2013). The Modern Phosphorus Sustainability Movement: A Profiling Experiment. *Sustainability*, 5(11), 4523–4545. <https://doi.org/10.3390/su5114523>

Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0380-z>

Yang, X. J., & Finnegan, P. M. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of Botany*, 105(4), 513–526. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq015>

ZADOKS, J. C., CHANG, T. T., & KONZAK, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>

Zaidi, A., Khan, M. S., & Ahmad, E. (2014). Microphos: Principles, Production and Application Strategies. In M. S. Khan, A. Zaidi, & J. Musarrat (Eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology* (pp. 1–30). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_1